

PENENTUAN AKTIVITAS β -Glukosidase PADA FERMENTASI SARI KEDELAI DENGAN KULTUR STARTER *Lactobacillus plantarum* B1765

DETERMINATION OF β -Glucosidase ACTIVITY IN FERMENTATION EXTRACT SOYA WITH STARTER CULTURE *Lactobacillus plantarum* B1765

Mar'atul Huda* dan Prima Retno Wikandari

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

Universitas Negeri Surabaya

Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author : e-mail: maratul.huda@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi sari kedelai terhadap pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765, pH, total asam, serta aktivitas enzim β -glukosidase yang dilakukan masing-masing selama 6, 12, 18, dan 24 jam pada suhu 37 °C. Penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap beberapa parameter yang meliputi pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765 diukur dengan metode spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 252 nm, pH dan total asam diukur dengan metode AOAC 1995, serta aktivitas β -glukosidase dengan metode Otieno (2007) yang diukur pada panjang gelombang 402 nm. Hasil penelitian menunjukkan pertumbuhan bakteri *Lactobacillus plantarum* B1765 mencapai fase log mulai pada jam ke-6 hingga jam ke-24 fermentasi. Perhitungan jumlah total asam tertitrasi didapatkan nilai tertinggi sebesar 1,19% dengan pH terendah sebesar 4,24 pada jam ke-24. Aktivitas β -glukosidase tertinggi terjadi pada jam ke-18, dengan aktivitas enzim mencapai 0,868 U/mL.

Kata kunci: sari kedelai, *Lactobacillus plantarum* B1765, β -glukosidase

Abstract. This study aimed to determine the effect of fermentation time of soymilk on the growth of *Lactobacillus plantarum* B1765, pH, total acid, and β -glucosidase enzyme activity were conducted respectively for 6, 12, 18, and 24 hours at temperatures of 37 °C. This research was conducted measurements of several parameters which include the growth of *Lactobacillus plantarum* B1765 measured by spektrofotometer UV-Vis method at a wavelength of 252 nm, pH and total acid measured by AOAC 1995 method, and β -glucosidase activity by Otieno (2007) method were measured at a wavelength of 402 nm. The results showed the growth of *Lactobacillus plantarum* B1765 reached log phase occurred from 6th hour until the 24th hour of fermentation. The calculation of the total amount of acid titration obtained the highest value of 1.19% with a pH lowest at 4.24 at the 24th hour. β -glucosidase activity was highest at the 18th, with the enzyme activity reached 0.868 U/mL.

Keywords: Extract soya, *Lactobacillus plantarum* B1765, β -glucosidase

PENDAHULUAN

Kesadaran besarnya hubungan antara makanan dan kemungkinan timbulnya penyakit, telah mengubah pandangan manusia bahwa makanan berguna untuk kesehatan. Komponen bioaktif pada makanan akan memberikan aspek fisiologis yang menimbulkan efek kesehatan, seperti sebagai

antioksidan [1]. Senyawa bioaktif yang dapat bertindak sebagai antioksidan adalah isoflavon [2].

Pada kedelai terdapat kandungan isoflavon yang berpotensi sebagai antioksidan, seperti genistein, daidzein, dan glisitein. Namun, kandungan isoflavon pada kedelai masih bersifat *inaktif*, karena bentuk terikat dengan

gula membentuk suatu glukosida. Fermentasi oleh bakteri asam laktat berperan dalam menghidrolisis isoflavon glukosida menghasilkan glikon (glukosa) dan aglikon (isoflavon) [3,4,5]. Hal ini disebabkan, bakteri asam laktat mampu menghasilkan enzim β -glukosidase yang berfungsi dalam hidrolisis senyawa isoflavon glukosida menghasilkan isoflavon dengan memutus ikatan β -D-glukosida [3,6], sehingga ketersediaan isoflavon meningkat.

Soygurt merupakan salah satu produk olahan fermentasi sari kedelai dengan penggunaan bakteri asam laktat. Fermentasi sari kedelai menjadi soygurt, menyebabkan senyawa isoflavon glukosida mengalami transformasi melalui proses hidrolisis oleh β -glukosidase sehingga banyak dihasilkan senyawa isoflavon yang memiliki sifat biologis lebih tinggi dari isoflavon glukosida [3,4].

Beberapa bakteri asam laktat yang diketahui mampu menghasilkan β -glukosidase meliputi *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* FNCC 098, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KFRI 01181, *Bifidobacterium breve* K-101, *Lactobacillus acidophilus* 4461, *Lactobacillus plantarum-pentosus* T20, *Lactobacillus plantarum* SMN 025, dan *Lactobacillus plantarum* KFRI 00144 [5,6,7].

Berdasarkan uraian diatas, beberapa strain *Lactobacillus plantarum* telah diteliti mampu menghasilkan β -glukosidase, namun belum ada penelitian tentang kemampuan *Lactobacillus plantarum* B1765 dalam menghasilkan β -glukosidase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama fermentasi soygurt terhadap pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765, pH, total asam, serta aktivitas β -glukosidase. Fermentasi soygurt oleh *Lactobacillus plantarum* B1765 ini diharapkan dapat memberikan meningkatkan nilai fungsional soygurt pada pangan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Kedelai *willis*, *Lactobacillus plantarum* B1765, MRS Broth merk Oxoid, NHCO_3 merk Merck, NaCl merk Merck, Na_2CO_3 merk Merck, NaOH merk Merck, CaCO_3 merk Merck, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ merk Merck, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ merk Merck, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ merk Merck, *p*-nitrofenol merk Sigma, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside merk Sigma, 1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil merk Merck, metanol *p.a* merk Merck, phenoltalein, dan aquades.

Alat

Peralatan gelas merk Pyrex, magnetic stirer, blue tip, tabung sentrifus, inkubator merk merk Memmert, mikropipet merk Eppendorf, sentrifus merk Eppendorf 5810 R, pH meter merk Martini, neraca analitik merk PioneerTM, lemari pendingin, autoklaf merk Hirayama HVE-50 merk, spektrofotometer UV-Vis merk Shimadzu 1800, laminar air flow merk Thermo Scientific, buret merk Pyrex, statif dan klem, dan blender merk Masipion.

PROSEDUR PENELITIAN

Pembuatan Kultur Starter

Starter *Lactobacillus plantarum* B1765 dikembangkan dalam medium MRS broth cair steril dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pembuatan Soygurt

Kedelai yang telah disortasi, direndam dengan air selama 12 jam (1 : 3) pada suhu kamar. Kedelai ditiriskan dan direndam dalam larutan NaHCO_3 0,5% selama 30 menit (1 : 3), kemudian dicuci dengan air bersih dan ditiriskan. Kedelai dihancurkan dengan blender dengan ditambahkan air panas (1 : 6), lalu disaring hingga didapatkan sari kedelai. Untuk mengurangi kontaminasi bakteri pathogen, sari kedelai direbus selama 5 menit (70-80 °C). 100 mL sari kedelai dimasukkan dalam botol kaca steril dan diinokulasi dengan *L. plantarum* B1765 sebanyak 1,5% (v/v). Sari kedelai diinkubasi pada suhu 37 °C dengan variasi lama fermentasi 6, 12, 18, dan 24 jam.

Pengukuran Pertumbuhan Mikroba

1 mL sampel dengan masing-masing lama fermentasi (6, 12, 18, dan 24 jam) diencerkan dalam 9 mL aquades steril. Diukur kerapatan optik dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 252 nm.

Pengukuran pH

10 mL sampel diaduk hingga homogen dan diukur pH menggunakan pH meter.

Pengukuran Total Asam

10 mL sampel diencerkan kedalam 100 mL labu ukur. 10 mL hasil pengenceran dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer dengan ditambahkan fenolftalein sebanyak 3 tetes, dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N.

Penentuan Aktivitas β -Glukosidase

10 mL sampel direaksikan dengan 1000 μ L ρ NPG 0,5% dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Ditambahkan 500 μ L Na₂CO₃ dingin 1M lalu disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbetuk diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum standart ρ NP yaitu 402 nm. Aktivitas β -glukosidase dinyatakan dalam unit per mililiter (U/mL) yang didefinisikan sebagai jumlah β -glukosidase yang dapat mengkatalisis reaksi pelepasan 1 μ mol ρ NP per menit permililiter [10].

Teknik Analisis Data

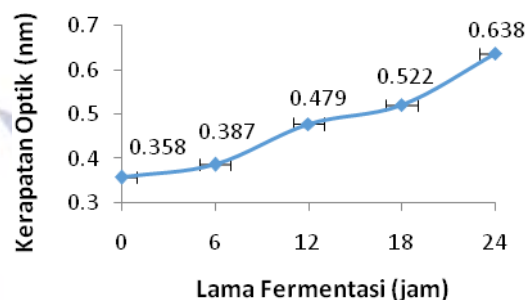
Hasil penelitian dinyatakan sebagai *mean* yang berasal dari pengujian tiga kali replikasi. Data dianalisis secara statistik menggunakan SPSS 16 dengan uji ANOVA Satu Arah dan uji beda Post Hoc *LSD* dengan nilai signifikan $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765

Kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765 pada media sari kedelai dengan masing-masing lama fermentasi 6, 12,

18, dan 24 jam diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 252 nm. Rerata kurva pertumbuhan *L. plantarum* B1765 disajikan pada Gambar 1. Hasil analisis statistik dengan uji ANOVA Satu Arah (*One Way Anava*) dan uji beda menunjukkan nilai signifikan $p < 0,05$, sehingga dapat dinyatakan bahwa ada pengaruh waktu pertumbuhan bakteri terhadap kerapatan optik sel *L. plantarum* B1765.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *L. plantarum* B1765

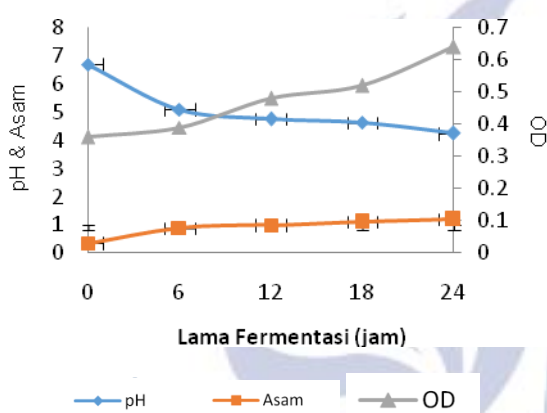
Pada Gambar 1 menunjukkan pola pertumbuhan *L. plantarum* B1765 hingga 24 jam fermentasi telah melewati dua fase, yaitu fase lag dan fase log. Pada awal pertumbuhan *L. plantarum* B1765 mengalami fase lag pada jam ke-0 hingga jam ke-6 fermentasi. Selama fase lag, sel bakteri starter membelah dengan kecepatan rendah pada media pertumbuhan baru karena adanya proses adaptasi dari media starter ke media pertumbuhan [8].

Fase log pertumbuhan *L. plantarum* B1765 terjadi mulai ke-6 dan mencapai pertumbuhan tertinggi pada jam ke-24. Selaras pertumbuhan *L. plantarum* SMN 025 pada media pertumbuhan sari kedelai, menunjukkan populasi sel tertinggi terjadi pada jam ke-24 fermentasi [6]. Peningkatan jumlah sel bakteri terjadi karena bakteri mulai memanfaatkan kebutuhan nutrisi untuk melakukan pembelahan sel [8]. Namun, bila dibandingkan kurva pertumbuhan *L. plantarum* B1765 pada medium MRS *Broth*, fase log terjadi lebih cepat yaitu pada jam ke-16 [9]. Hal ini disebabkan kandungan karbohidrat pada kedelai masih dalam bentuk oligosakarida dan polisakarida [10], sehingga dibutuhkan waktu

yang lebih lama untuk memecah karbohidrat menjadi glukosa.

Total Asam dan pH

Pada penelitian ini kenaikan kadar asam disebabkan adanya aktivitas bakteri asam laktat *L. plantarum* B1765 dalam merombak glukosa menjadi asam laktat dan menyebabkan penurunan nilai pH. Hubungan antara total asam, pH, dan kurva pertumbuhan *L. plantarum* B1765 ditunjukkan pada Gambar 2. Data uji menggunakan ANOVA Satu Arah dan uji beda menunjukkan nilai signifikan $p < 0,05$.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan *L. plantarum* B1765

Pada Gambar 2. penurunan pH terjadi selama fermentasi, dengan nilai awal 6,70 menjadi 4,24. Selaras dengan total asam tertitiasi yang semakin meningkat hingga mencapai 1,19% pada jam ke-24 fermentasi. Hal ini disebabkan pada jam ke-24 merupakan fase log *L. plantarum* B1765, dimana sumber energi banyak terpenuhi sehingga semakin banyak glukosa yang dirombak menjadi asam laktat yang akan menurunkan pH pada soygurt.

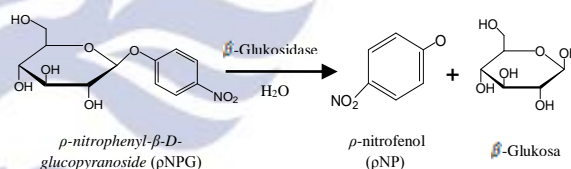
Disamping itu, penurunan pH disebabkan peningkatan jumlah glukosa pada sari kedelai diduga adanya beberapa aktivitas enzim tertentu. Bakteri *L. plantarum* diketahui mampu menghasilkan beberapa enzim, seperti α -galaktosidase (galaktosa + sukrosa) [11], invertase (glukosa + fruktosa) [12], dan β -glukosidase (glukosa + isoflavon) [6]. Berdasarkan kemampuan *L. plantarum*

tersebut memungkinkan terjadi peningkatan glukosa, sehingga dapat dihasilkan asam laktat yang lebih banyak pada soygurt.

Pada pembuatan soygurt dengan penggunaan kultur campuran *Streptococcus thermophilus* dan *L. bulgaricus* dihasilkan nilai pH terendah sebesar 5,01 selama 18 jam fermentasi [10]. Pernyataan tersebut menunjukkan bahwa kultur tunggal *L. plantarum* B1765 diduga mempunyai kemampuan dalam menghasilkan asam yang lebih banyak dan pH yang lebih rendah dibandingkan kultur starter yang telah umum digunakan dalam pembuatan soygurt.

Aktivitas β -glukosidase

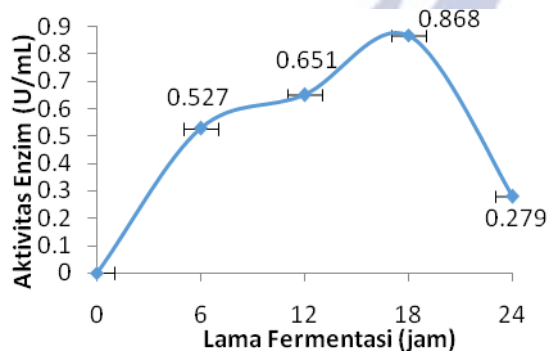
Analisis aktivitas β -glukosidase menggunakan metode Otieno (2007) dengan penggunaan *p*-nitrofenil- β -glukopiranosida (*p*NPG) sebagai substrat. Aktivitas β -glukosidase dinyatakan dalam satuan Unit/mL yang didefinisikan sebagai jumlah 1 μ mol *p*-nitrofenol (*p*NP) yang dibentuk per menit per milliliter enzim pada kondisi percobaan. Reaksi yang terjadi tampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi Hidrolisis *p*NPG oleh β -glukosidase

β -glukosidase (β -D-glucoside glucohydrolase) merupakan enzim yang berperan dalam hidrolisis senyawa glukosida dengan memutus pada ikatan β -D-glukosida menghasilkan senyawa gula (glikon) dan bukan gula (aglikon) [3]. Pada fermentasi sari kedelai ketersediaan senyawa isoflavon bioaktif dapat meningkat yang disebabkan penggunaan bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan β -glukosidase. Pada fermentasi tersebut β -glukosidase akan menghidrolisis senyawa isoflavon glukosida menghasilkan senyawa isoflavon dan glukosa [13].

Besar aktivitas β -glukosidase pada soygurt, berdasarkan lama fermentasi didapatkan aktivitas tertinggi pada jam ke-18 fermentasi sebesar 0,868 U/mL dan mengalami penurunan hingga 0,279 U/mL pada jam ke-24 (Gambar 4). Pada lama fermentasi 24 jam diduga substrat telah habis digunakan untuk pertumbuhan *L.plantarum* B176 mencapai fase log, sehingga aktivitas β -glukosidase menurun. Adapun hasil uji statistik menggunakan ANOVA Satu Arah dan uji beda menunjukkan nilai signifikan $p < 0,05$, pada aktivitas β -glukosidase terhadap pengaruh lama fermentasi.



Gambar 4. Grafik Hubungan Aktivitas β -glukosidase dengan Lama Fermentasi

Aktivitas β -glukosidase oleh *L. plantarum* B1765 diketahui lebih tinggi dibandingkan *L. plantarum* SMN 025 yang didapatkan sebesar 0,653 U/mL [6], sedangkan penggunaan kultur starter *L. acidophilus* 4461 mampu menghasilkan aktivitas hingga 2,204 U/mL [3].

PENUTUP

Simpulan

Pengaruh lama fermentasi soygurt dengan penggunaan kultur starter *Lactobacillus plantarum* B1765 mempengaruhi peningkatan kurva pertumbuhan bakteri dengan dicapai fase log pada jam ke-24 fermentasi. Nilai pH terendah soygurt didapatkan sebesar 4,24 dengan persen total asam 1,19% pada jam ke-24. Aktivitas β -glukosidase oleh *Lactobacillus*

plantarum B1765 tertinggi dicapai pada jam ke-18 fermentasi sebesar 0,868 U/mL.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut terhadap optimasi pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765 pada media pertumbuhan sari kedelai agar diperoleh aktivitas β -glukosidase yang maksimum.

DAFTAR PUSTAKA

1. Marsono, Yustinus. 2007. *Prospek Pengembangan Makanan Fungsional*. Seminar Nasional *National Food Technology Competition (NFTC)*. Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Unika Widya Mandala Surabaya.
2. Saija, A., Scales M., Lanz M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. 1995. Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of their Interaction with Biomembranes. *Free Radical Biological & Medicine*. Vol. 19 (4): pp 481-486.
3. Pyo, Y.H., T.C. Lee, & Y.C. Lee, 2005. Enrichments of Bioactives Isoflavones in Soymilk Fermentation with β -glukosidase Producing Lactic Acid Bacteria. *Food Research International*. Vol 38, pp: 551-559.
4. Rekha, C.R., G. Vijayalakshmi. 2010. Soybased Functional Food with Reference to Probiotic and Isoflavones. *Thesis*. Departement of Food Microbiology. India: Central Food Technological Research Institute.
5. Titiek, F.D., Umar, S., Nur Cahyanto, M., Takuya, S., Endang, S. R. and Kosuke, N. 2013. Effect of Indigenous Lactic Acid Bacteria Fermentation on Enrichment of Isoflavone and Antioxidant Properties of Kerandang (*Canavalia virosa*) extract. *International Food Research Journal*. Vol. 20 (5), pp 2945-2940.

6. Sumarna. 2009. Hydrolysis of Bioactive Isoflavone in Soymilk Fermented with β -glucosidase Producing Lactic Acid Bacteria from Local Fermented Foods of Indonesian. *Malaysian Journal of Microbiology*. Vol. 6 (1), pp: 30-40.
7. Otieno, Daniel O. 2007. Stability of Bioactive Isoflavones and Glycolytic Enzymes Produced by Probiotic Bacteria in Soy Based Food during Processing and Storage. *Disertasi*. Australia: Victoria University.
8. Plezcar, Michael J. Jr.. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
9. Panggayuh, Diah P. dan Wikandari. 2014. Pengaruh Konsentrasi Amonium Sulfat Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler *Lactobacillus Plantarum* B1765 Isolat Bekasam. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
10. Yusmarini, Adnan M. dan Hadiwiyoto S. 1998. Perubahan Oligosakarida pada Susu Kedelai dalam Proses Pembuatan Yogurt. *Berkala Penelitian Pasca Sarjana (BPPS)*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
11. Bordignon, J.R., Kazuhiko N., Tadashi Y., Sayuki N. 2004. Hydrolysis of Isoflavones and Consumption of Oligosaccharides during Lactic Acid Fermentation of Soybean Milk. *Japan International Research Center for Agricultural Science (JIRCAS)*. Vol 38 (4), pp: 259-265.
12. Subhraveti, P. 2014. *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 Pathway: Sucrose Degradation III (Sucrose Invertase). (Online). (<http://www.biocyc.org/lpla525338-pathway&object=pwy621&detail-level=3>, diakses 5 Oktober 2015).
13. Coward, L., Barnes, N., Setchell, K.D.R., Barnes, S. 1993. Genestein and Deidzein and their β -Glicoside Conjugates Anti-Tumor Isoflavones in Soybeans Foods from American and Asian Diets. *Journal Agriculture Food Chem.* Vol 41, pp: 1961-1967.